

DAS VORKOMMEN VON ANTIKÖRPERN GEGEN
DAS EPSTEIN-BARR VIRUS BEI KINDERN
UND ERWACHSENEN

HEINZ STRASSER

1972

Aus der Kinderklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Klaus Betke

DAS VORKOMMEN VON ANTIKÖRPERN GEGEN DAS EPSTEIN-BARR
VIRUS BEI KINDERN UND ERWACHSENEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Heinz Straßer

aus

Neckarsulm

im Jahre

1972



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Otmar Goetz
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Klaus Betke
Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juni 1972

DAS VORKOMMEN VON ANTIKÖRPERN GEGEN DAS EPSTEIN-BARR VIRUS BEI KINDERN UND ERWACHSENEN

Einleitung:

1958 beschrieb der in Uganda arbeitende britische Chirurg Denis Burkitt zum ersten Mal ausführlich ein malignes Lymphom bei Kindern, welches vor allem den Kiefer- und Orbitalbereich, sowie die Ovarien befällt. Es wurde bekannt unter dem Namen "Burkitt Lymphom". Außer der charakteristischen Altersverteilung (1) - (der Tumor tritt normalerweise nicht auf bei Kindern unter zwei Jahren, seine Häufigkeit nimmt zu bis zum sechsten und siebten Lebensjahr und fällt dann wieder ab; Tumoren jenseits des 20. Lebensjahres sind große Seltenheiten) - fiel der Tumor durch sein geographisch begrenztes Vorkommen auf: man findet ihn mit wenigen Ausnahmen nur innerhalb ganz bestimmter Klimazonen (2,3), abhängig von Höhe, Temperatur und Niederschlagsmenge. Auf Grund dieser Tatsache tauchte die Theorie auf, der Tumor könnte durch ein infektiöses Agens, vermutlich ein durch Insekten übertragenes Virus entstehen (4). Epstein und Barr gelang es 1964 in einer Tumorzellkultur ein bis dahin unbekanntes Virus der Herpesgruppe nachzuweisen (5). Es wurde bekannt unter dem Namen Epstein-Barr Virus (EBV). 1966 veröffentlichte das Ehepaar Henle die Technik eines Immunofluoreszenztests (6), mit dem es gelang, auf relativ einfache Weise Antikörper (AK) gegen das EBV nachzuweisen. Damit war die Möglichkeit zu systematischen Untersuchungen über das Vorkommen und die Verbreitung dieses Virus gegeben. Es stellte sich heraus, daß das Virus weltweit vorkommt und daß ein großer Teil der erwachsenen Bevölkerung AK gegen dieses Virus besitzt (7,8,9). Es kann also nicht allein als ätiologisches Agens

für die Entstehung des Burkitt Lymphoms verantwortlich gemacht werden. Andererseits haben fast alle Burkitt Tumorkranken einen positiven EBV-Test, meist mit sehr hohen Titern. Ähnlich hohe Titer wurden bei Sarkomen des RES festgestellt. Diese Befunde scheinen sich in unserem Labor teilweise - insbesondere bei Morbus Hodgkin - zu bestätigen.

Seit zwei Jahren wird das EBV auch für das Entstehen der Infektösen Mononukleose verantwortlich gemacht. Es wird über ein regelmäßiges Ansteigen des Anti-EBV-Titers bei dieser Krankheit berichtet (10,11).

Ein drittes Krankheitsbild, das mit EBV in Verbindung gebracht wird, ist das sogenannte Posttransfusionssyndrom. Es laufen hier ebenfalls Versuche, die eine Beteiligung dieses Virus nachweisen oder ausschließen sollen.

Aus der Bundesrepublik Deutschland liegen bisher noch keine Unterlagen über die allgemeine Durchseuchung mit EBV vor. Der Zweck meiner Arbeit war es, die Grunddurchseuchung mit EBV im Einzugsbereich der Münchner Universitätskliniken zu bestimmen und damit eine Basis für die obengenannten Arbeiten zu schaffen.

MATERIAL UND METHODEN

Es wurde die leicht modifizierte Methode der indirekten Immunfluoreszenz von Henle und Henle (1966) benutzt (6).

Zellen: Die von uns benützten, EBV-tragenden Zellen sind in der Literatur als EB₃-Stamm bekannt. Sie wurden uns freundlicherweise von Herrn Professor Henle (Philadelphia) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in 100ml Steilbrustflaschen bei 37 Grad Celsius gezüchtet. Die Nährflüssigkeit setzte sich folgendermaßen zusammen:

80% Eagle's Basal Medium

10% fetales Kälberserum

10% NaHCO₃-Lösung (5,6%-ig)

100 I.E./ml Streptomycin

100 I.E./ml Penicillin

Fütterung:

Einmal wöchentlich wurden die Kulturen halbiert und das fehlende Volumen durch frische Nährlösung ersetzt.

Zellausstriche: Zellen, die zur Färbung verwendet werden sollten, wurden drei bis vier Tage in argininfreiem Medium gehalten, um die Zahl der virustragenden Zellen zu erhöhen (12). Die Zellsuspension - Burkitt Tumorzellen schwimmen frei im Nährmedium (13) - wurde bei 1800 x g zwanzig Minuten lang zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit bis auf einige Tropfen weggeschüttet. In diesen wurden die zurückbleibenden Zellen aufgeschwemmt und mit Hilfe einer Öse auf Mikroobjektträger (7x30mm große Glasplättchen) ausgestrichen. Die Ausstriche wurden bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend zehn Minuten lang in Azeton fixiert. Diese Präparate wurden bei

-20 Grad Celsius bis zur Färbung aufgehoben.

Die indirekte Fluoreszenzfärbung: Jeweils fünf dieser vorbereiteten Glasplättchen wurden mit ihrem einen Ende auf einen normalgroßen Standardobjektträger geklebt, so daß das andere Ende frei vom Standardobjektträger wegstand. Auf das freie Ende wurde die zu untersuchende Serumverdünnung aufgetragen. Wenn nichts anderes vermerkt ist, wurde das Serum 1:8 in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (14) verdünnt. Jedes Glasplättchen wurde durch eine Nummer auf dem Objektträger bezeichnet.

Die mit Serum überschichteten Glasplättchen wurden in einer feuchten Kammer für eine halbe Stunde bei 37 Grad Celsius inkubiert, um eine Antigen - Antikörperreaktion zwischen dem intrazellulären EBV und eventuell im Serum vorhandenen AK zu ermöglichen. Anschließend wurden die Standardobjektträger mit den Glasplättchen nach unten so in PBS-gefüllte Küvetten gehängt, daß die Glasplättchen voll im Puffer hingen, der Standardobjektträger jedoch frei blieb. Mit Hilfe eines Magnetrührers wurden die Zellausstriche nun eine halbe Stunde lang gewaschen, um das menschliche Serum zu entfernen, außer dem eventuell zustande gekommenen Antigen - Antikörperkomplex. Anschließend wurden die Zellausstriche mit Antikörpern überschichtet, die gegen menschliches Gammaglobulin gerichtet sind, von einem Pferd stammten und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) konjugiert waren. Wir bezogen dieses FITC-conjugated anti-human gamma globulin (horse) von den "Flow Laboratories", Irvine, Scotland. In Testversuchen wurde die Endverdünnung dieses FITC-Konjugats mit 1:80 bestimmt. Für die Untersuchungen wurde es ausschließlich in der Verdünnung 1:15 verwendet. Die Glasplättchen wurden dann erneut - genau wie oben erklärt - inkubiert und gewaschen und zum Abschluß eine Minute in destilliertes Wasser getaucht.

Schließlich wurden die Glasplättchen vom Standardobjektträger abgebrochen und einzeln mit der Zellseite nach unten auf neue Objektträger in ein Gemisch aus drei Teilen PBS und einem Teil Glycerin eingebettet.

Die Präparate wurden mit einem Photomikroskop der Firma Carl Zeiss, Oberkochen ausgewertet. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberhöchstdrucklampe HBO 200 W.

Als Filter wurden verwendet:

Okularsperrfilter: Filter 50

Erregerlichtfilter: Filter BG 12/4

Positive Präparate zeigten bei 10-15% der vorhandenen Zellen ein helles, brillantes, "apfelgrünes" Fluoreszieren. Bei jeder Färbung wurden ein bekannt positives und ein bekannt negatives Serum, sowie ein nur mit Puffer beladener Zellausstrich als Kontrollen mitgeführt.

Seren: Die Seren der Kinder und Jugendlichen stammen aus der hiesigen Universitätskinderklinik. Keines dieser Kinder litt an einer Krankheit, die zu den in der Einleitung erwähnten gehört und mit dem EBV in Beziehung gebracht werden könnte.

Die Erwachsenenserum setzen sich aus Seren des Hygienischen Instituts der Universität München, der Medizinischen Klinik der Universität München und aus Soldatenserum zusammen. Auch bei diesen Seren war kein Zusammenhang mit den in der Einleitung erwähnten Krankheiten zu sehen. Es handelt sich also bei allen Spendern um Personen, die klinisch keinen Hinweis auf eine aktive EBV-Infektion boten. Alle seren wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20 Grad Celsius gelagert und wenn nichts anderes vermerkt ist, mit PBS im Ver-

hältnis 1:8 verdünnt verwendet.

ERGEBNISSE

Wie aus Tabelle 1 und Figur 1 hervorgeht, waren von insgesamt 403 untersuchten Seren 191, das sind 47%, positiv. Innerhalb der ersten sechs Lebensmonate weisen 50% der Kinder AK gegen das EBV auf. Im zweiten Lebenshalbjahr wird ein Minimum von 10% erreicht. Von da ab nimmt die Häufigkeit von AK wieder zu, bis schließlich im sechsten und siebten Dezenium 77% aller untersuchten Personen EBV-positiv sind.

Bei positivem Ausfall des Testes waren die Brillanz und die Helligkeit der aufleuchtenden Zellen verschieden. Dem wurde Rechnung getragen: ein schwaches, jedoch noch deutlich erkennbares Fluoreszieren wurde mit "+" bezeichnet, ein starkes Fluoreszieren mit "++" und ausgesprochen helle, sehr kräftige Brillanz bekam die Bezeichnung "+++".

Tabelle 1:

Alter	Anzahl	-	+	++	+++	% +
0-5 Mon.	60	30	13	13	4	50
6-12 Mon.	38	34	2	1	1	10
1-4 Jahre	62	43	9	8	2	31
5-9 Jahre	43	27	5	9	2	37
10-19 J.	31	15	6	8	2	50
20-49 J.	121	52	28	33	8	57
50-69 J.	48	11	0	29	8	77
Summe	403	212		191		47%

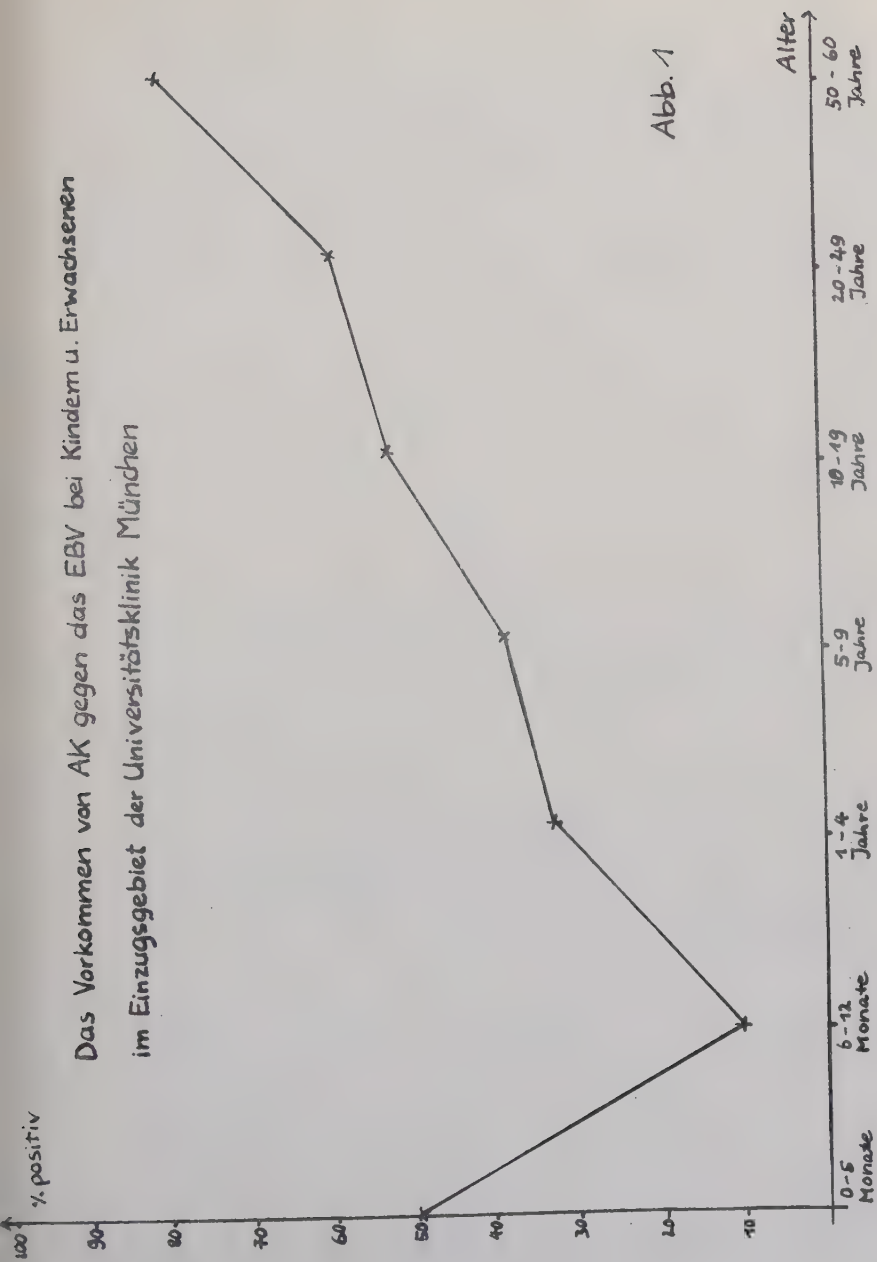


Abb. 1

Die dreifach positiven Fälle wurden, soweit noch Serum vorhanden war, austitriert. Sie wurden in Serumverdünnungen von 1:10, 1:20, 1:40 usw. erneut gefärbt. Der reziproke Wert derjenigen Verdünnung, bei der das Präparat noch eine schwache jedoch noch deutlich erkennbare Fluoreszenz aufwies (entsprechend einem +), wurde als Endtiter angenommen. Von den

Tabelle 2:

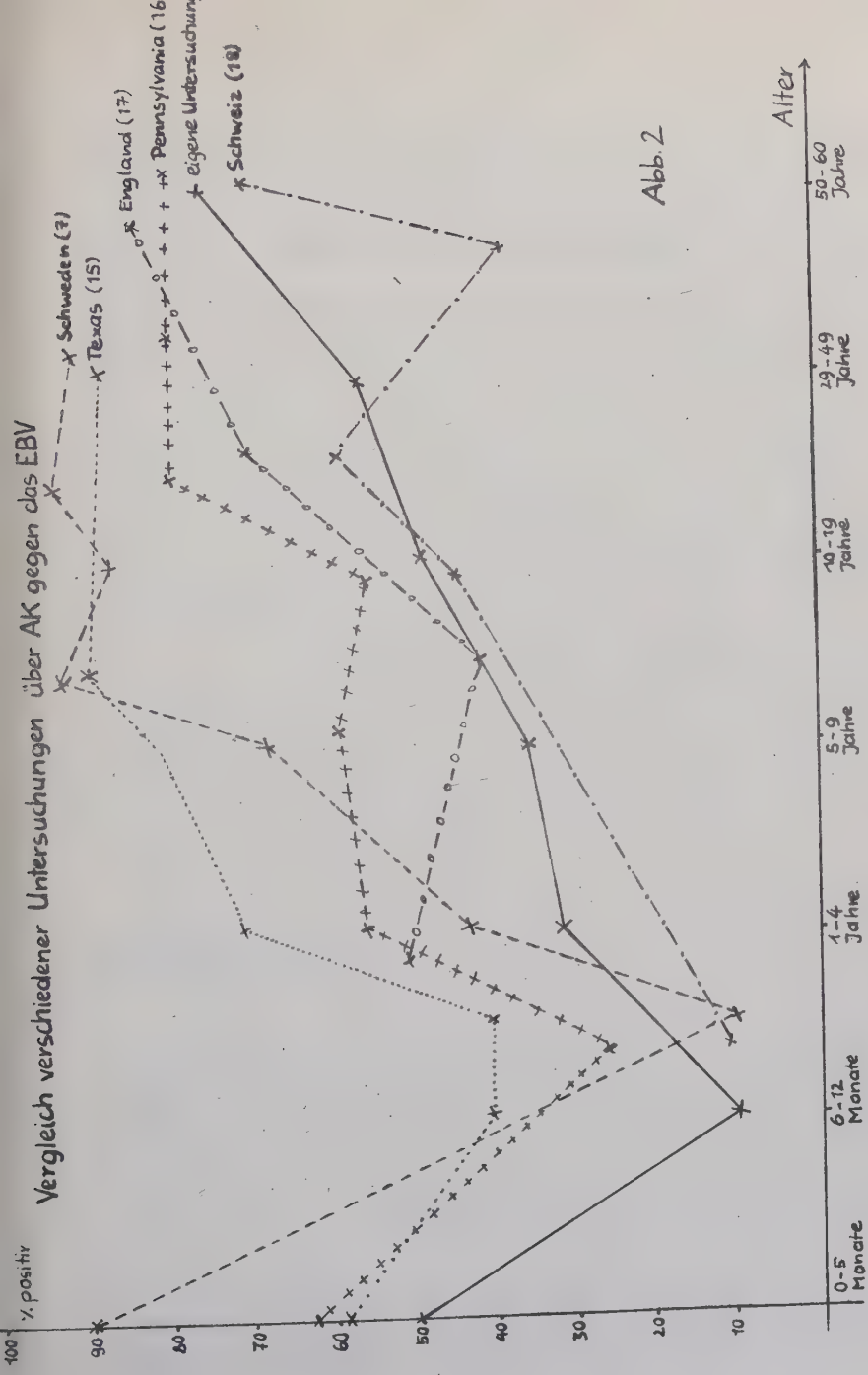
Endtiter	10	20	40	80	160	320
Anzahl der Seren	1	9	8	0	0	2

27 dreifach positiven Seren wurden 20 austitriert (s. Tab. 2).

In einem Fall liegt der Endtiter bei 10; neun Seren zeigten Endtiter von 20, acht Seren von 40. Zwei Seren zeigten Titer von 320.

Die AK-Verteilung zwischen männlichem und weiblichem Geschlecht

Von 100 ausgezählten Seren weiblicher Individuen waren 43 positiv. Von 100 Seren männlicher Individuen waren 47 positiv. Das kommt einem Verhältnis von 1:1 sehr nahe und stimmt mit den Ergebnissen anderer Untersucher überein (17).



DISKUSSION

Der Kurvenverlauf in Figur 1 entspricht prinzipiell der AK-Entwicklung gegen eine Reihe anderer, weit verbreiteter Viren, wie z. B. Herpes simplex, Rubella, Cytomegalie. In den ersten sechs Lebensmonaten besitzt ein relativ hoher Prozentsatz der Kinder noch mütterliche AK. Diese verschwinden dann und die Wahrscheinlichkeit, daß ein Individuum mit einem Virus - in diesem Fall dem EBV - in Berührung gekommen ist, nimmt mit steigendem Lebensalter zu. Diese Tatsache kommt in der nun stetig steigenden Kurve zum Ausdruck. Bei der Altersgruppe 20-40 Jahre, in die die meisten Schwangerschaften fallen, fanden wir fast den gleichen Prozentsatz EBV-positiv, wie bei den Säuglingen bis zum sechsten Monat. Damit findet die Ansicht, daß es sich hierbei um diaplazentar übertragene AK handelt ihre Bestätigung.

Die Titer, die bei den Titrationen gefunden wurden, zeigten mit zwei Ausnahmen Werte, die in der Literatur im allgemeinen noch als niedrig bezeichnet werden und ohne weiteres bei gesunden Menschen vorkommen können. Bei den zwei Seren, die Titer von 320 haben, muß schon an eine der in der Einleitung erwähnten Krankheiten gedacht werden. Die Krankengeschichten zeigten jedoch nichts in dieser Richtung. Es handelt sich einmal um eine 55-jährige Patientin mit einem Herzklappenfehler, zum anderen um eine 51-jährige Patientin mit einer Hyperthyreose.

Abb. 2 zeigt einen Vergleich der eigenen Untersuchung mit den Ergebnissen in anderen Ländern. Es war etwas schwierig, die verschiedenen Kurven in ein einziges Koordinatensystem einzubauen, da jeder Autor die Altersgruppen etwas anders zusammenstellte. Trotzdem sind die Kurvenverläufe wohl eindeutig zu beurteilen.

Es gibt ein zweites Problem, das einen Vergleich der verschiedenen Ergebnisse erschwert: Erfahrungsgemäß ist die Empfindlichkeit der Methode in jedem Institut unterschiedlich. Porter u. a. (Texas) (15)

stellten durch Austausch von Seren fest, daß der durchschnittliche Titer der gleichen positiven Seren in ihrem Labor bei 574 liegt, bei den Henles in Pennsylvania dagegen nur bei 108, was einem Empfindlichkeitsunterschied von 1:5,3 entspricht. Schuld daran sind vor allem die Unterschiede in den verwendeten antihumanen Gammaglobulinen, wie die oben genannten Autoren nachweisen konnten. Diese Fehlerquelle muß bei einem Vergleich der Kurven immer bedacht werden. Trotzdem läßt sich wohl sagen, daß eine charakteristische Altersverteilung der gegen das EBV gerichteten AK besteht, und daß man sie bei 50-90% der Erwachsenen vieler, wenn nicht aller Länder nachweisen kann. Grundsätzliche Unterschiede scheinen zwischen den verschiedenen Gebieten der Erde nicht zu bestehen. In Europa sind die eigenen Untersuchungen mit denen der Schweiz nahezu deckungsgleich.

Es wurde verschiedentlich darauf hingewiesen (8,15,16,17), daß Personen aus niedrigen sozialen Schichten früher und häufiger mit EBV in Berührung kommen, als vergleichbare Personen aus höheren sozialen Schichten. Da uns die zu diesem Vergleich notwendigen Unterlagen jedoch fehlten, mußte diese Auswertung wegfallen.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden 403 Seren aller Altersgruppen auf ihren Gehalt an Antikörpern gegen das EBV geprüft. In den ersten sechs Lebensmonaten waren 50% der getesteten Seren positiv. Im zweiten Lebenshalbjahr wurde ein Minimum von 10% positiver Seren erreicht. Danach stieg das Antikörpervorkommen stetig an, bis im Alter von 50-70 Jahren 77% aller Seren positiv waren. Dies entspricht weitgehend den Verlaufskurven, wie man sie auch in anderen Ländern der Erde gefunden hat.

Bei Fräulein Nickl bedanke ich mich für die hervorragende Betreuung der Zellkulturen, bei Fräulein Oettrich für die freundliche technische Hilfe.

LITERATURNACHWEIS

- 1 Weight, D.H.: The Epidemiology of Burkitt's Tumor, Cancer Research, 27:2424-2438, 1967
- 2 Burkitt, D.B., Davies, J.N.P.: Lymphoma Syndrome in Uganda and Tropical Africa, Med. Press 245:367-9, 1961
- 3 Haddow, A.J., An Improved Map for the Study of Burkitt Lymphoma's Syndrome in Africa, E. Afr. Med. Journal 40:429-32, 1964
- 4 Burkitt, D.B., Observations on the Geography of Malignant Lymphoma, E. Afr. Med. Journal, 38:511-14, 1961
- 5 Epstein, M.A., Achong, B.G., Barr, J.M., Virus Particles in Cultured Lymphoblasts of Burkitt Lymphomas, Lancet I:702-3, 1964
- 6 Henle, G., Henle, W., Immunofluorescence in Cells Derived from Burkitt Lymphoma, Journal of Bact. 91:1248-56, 1966
- 7 Aberra Demissie, Arne Svedmyr, Age Distribution in Swedish Children, Acta Path. Microbiol. Scand. 73:653-54, 1968
- 8 G. Henle, W. Henle, G. Clifford, V. Diehl, G.W. Kafuko, G. Klein, R.H. Morrow, G.M.R. Manube, P. Pike, P.M. Tukei, J.L. Ziegler, Antibodies to Epstein-Barr Virus in Burkitt's Lymphoma and Control Groups, Journal of the Nat. Canc. Inst. 43:1147-57, 1969

- 9 Niedermann, Evans, Mc Collum, Prevalence, Incidence and Persistence of Epstein-Barr Virus Antibody in Young Adults, The New England Med. Journal 1282:361-65, 1970
- 10 Henle, G., Henle W., Diehl, V., Relation of Burkitt's Tumor Associated Herpes-Type Virus to Infectious Mononucleosis, Proceedings of the Nat. Acad. of Science 59:94-101, 1968
- 11 B. Warren, K. Lantrop, G. Sterner, A. Epsmark, Epstein-Barr Virus Antibodies in Family Contacts of Patients with Infectious Mononucleosis, Proc. of the Soc. of Exp. Biol. 133:936-39, 1970
- 12 G. Henle, W. Henle, Effect of Arginine-Deficient Media on the Herpes-Type Virus Associated with Cultured Burkitt Tumor Cells, Journal of Virology 2:182-91, 1966
- 13 J. Burchenal, D.P. Burkitt, Treatment of Burkitt's Tumor, Springer-Verlag 1967, Seite 24
- 14 D.W.G. Busby, W. House, J.R. McDonald, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Virological Technic, London 1964, Seite 125
- 15 D.P. Potter, I. Wimberly, M. Benysh-Melnik, Prevalence of Antibodies to Epstein-Barr Virus and other Herpes Viruses, Journal of the American Med. Ass. 208:1675-79, 1969

- 16 G. Henle, W. Henle, Immunofluorescence, Interference and Complement Fixation Technics in the Detection of the Herpes-Type Virus in Burkitt Tumor Cells, Cancer Research 27:2442-46, 1967
- 17 M.S. Pereira, J.M. Blake, A.D. Makrae, Epstein-Barr Virus Antibodies at Different Ages, Brit. Med. Journal 4:525-27, 1969
- 18 H.O. Gsell, H. Löffler, B. Müller, Serumantikörper gegen das Epstein-Barr Virus bei Mononucleosis Infectiosa, Schweizerische Med. Wochenschrift 100:495-500, 1970

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Otmar Goetz danke
ich für die Überlassung des Themas sowie für seine dauern-
de kritische Betreuung im Verlaufe der Arbeit

LEBENS LAUF

Ich wurde am 25.1.1947 in Neckarsulm, Kreis Heilbronn geboren. 1949 zog ich mit meinen Eltern nach Icking bei München. In Icking ging ich vier Jahre in die Volksschule, neun Jahre aufs Gymnasium, 1966 machte ich dort mein Abitur. An der Ludwig-Maximilians-Universität in München studierte ich anschließend elf Semester Humanmedizin. Ich habe mein Studium im Juni 1972 mit dem Staatsexamen abgeschlossen.

